

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

Offenlegungsschrift
10 DE 43 18 387 A 1

51 Int. Cl.⁵:
C 12 N 5/00
C 12 N 15/63
C 12 N 15/86
A 61 K 31/70

21 Aktenzeichen: P 43 18 387.5
22 Anmeldetag: 3. 6. 93
43 Offenlegungstag: 8. 12. 94

DE 43 18 387 A 1

71 Anmelder:
Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE

72 Erfinder:
ter Meulen, Volker, Prof. Dr., 97222 Rímtar, DE;
Rethwilm, Axel, Dr., 97080 Würzburg, DE

64 Rekombinante Foamy Virus Vektoren für medizinische und diagnostische Anwendungen sowie Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Foamy Virus Vektoren

57 Die vorliegende Erfindung betrifft die Darstellung neuer Vektorsysteme, die durch gentechnische in vitro Neukombination von Nukleinsäuren von Foamy Virus Species und exogener Nukleinsäure erzeugt werden und durch geeignete Wirtszellen oder durch gentechnisch veränderte Verpackungszelllinien produziert werden. Die gentechnische Darstellung besonders geeigneter Verpackungszelllinien ist ebenfalls Bestandteil dieser Erfindung. Der sichere und effiziente Transfer therapeutischer und anderer Gene durch Foamy Virus Vektoren in eukaryotische Zellen zeichnet diese Erfindung aus.

DE 43 18 387 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 10. 94 408 049/170

12/39

Die vorliegende Erfindung betrifft die Darstellung neuer Vektorsysteme, die durch gentechnische in vitro Neukombination von Nukleinsäuren von Foamy Virus Species und exogener Nukleinsäure erzeugt werden und durch geeignete Wirtszellen oder durch gentechnisch veränderte Verpackungszelllinien produziert werden. Die gentechnische Darstellung besonders geeigneter Verpackungszelllinien ist ebenfalls Bestandteil dieser Erfindung. Der sichere und effiziente Transfer therapeutischer und anderer Gene durch Foamy Virus Vektoren in eukaryotische Zellen zeichnet diese Erfindung aus.

Die Foamy Virus Vektoren erreichen ein extrem breites Spektrum eukaryotischer Zellen: sie transduzieren sehr unterschiedliche Säugetierzellen, insbesondere können sie für den Gentransfer in viele, unterschiedliche somatische Zellen des Menschen verwendet werden.

Die Foamy Virus Vektoren zeichnen sich durch eine große Aufnahmekapazität für exogene DNA-Fragmente aus.

Die Expression exogener DNA in den Foamy Virus Vektoren läßt sich zum Beispiel durch den viralen Transaktivator bel-1 stringent regulieren, wenn im Vektor kein exogener Promotor verwendet wird.

Die von Foamy Virus abgeleiteten Foamy Virus Vektoren sind im Menschen apathogen und lassen sich daher sicher verwenden. Die sichere Verwendung ergibt sich auch daraus, daß in chromosomaler DNA des Menschen keine homologen DNA-Sequenzen vorkommen und Anlaß zu homologer Rekombination von Foamy Virus Vektor und zellulärer DNA geben können. Foamy Viren sind phylogentisch distinkt gegenüber anderem Retroviren.

Von Foamy Virus und seinen abgeleiteten Vektoren ist kein oncogenes Potential bekannt.

Replikationskompetente Foamy Virus Vektoren wurden z. B. durch Deletion der Virusgene bel-2 und bel-3 dargestellt.

Den Foamy Virus Vektoren pFOV-1, pFOV-2 und pFOV-3 ist z. B. gemeinsam eine Deletion von etwa 420 Basenpaaren in 3'-Richtung anschließend an das bel-1 Gen.

Weiterhin wurden replikationskompetente Foamy Virus Vektoren wie z. B. pFOV-4 dargestellt, die sich in ebenfalls gentechnisch dargestellten Verpackungszelllinien produzieren lassen.

Foamy Virus Vektoren sind geeignet für die Expression exogener DNA in menschlichen oder tierischen Zielzellen zur Bildung therapeutisch wirksamer Proteine oder Antisense-RNA oder Köder-RNA. Foamy Virus Vektoren sind geeignet für die Expression exogener DNA in Menschen oder Tieren zur Erzeugung einer humoralen Immunität und/oder einer zellulären Immunität.

Foamy Virus Vektoren sind geeignet, durch die Auswahl der exogenen Nukleinsäure des Vektors in der chromosomalen DNA der Zielzellen in Menschen oder Tieren durch homologe Rekombination unerwünschte Gene zu inaktivieren oder Gendefizite zu komplementieren.

Foamy Virus Vektoren sind geeignet, durch die Regulation der Expression eines Reportergens im Zielgewebe oder durch andere Genkonstruktionen als diagnostisches Agens verwendet zu werden.

Humanes Foamy Virus (HFV) gehört zur Spumavirus-Familie der Retroviren. Die Spumavirus-Familie der

Retroviren unterscheidet sich deutlich von anderen Retroviren [R.M. Flügel et al., EMBO J. 6 2077-2084 (1987); B. Maurer et al., J. Virol. 62 1590-1597 (1988); A. Rethwilm et al., Nucleic Acids Res. 18, 733-738 (1990)].

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Erfindung ist, daß eine Pathogenität für HFV-Isolate bislang im Menschen nicht nachgewiesen werden konnte. Da HFV weiterhin eine Vielzahl unterschiedlicher Zell-Typen in menschlichem Gewebe transduziert, wurden abgeleitet vom infektiösen molekularen Klon pHSRC [A. Rethwilm et al., Nucleic Acids Research 18 733-738 (1990)] Vektoren als "Gene Delivery Systems" entwickelt, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind. Foamy Virus als Vektor für das "Gene Delivery" ist neu.

HFV-Vektoren unterscheiden sich grundsätzlich von anderen retroviralen Vektoren wie z. B. MoMLV (Moloney Murine Leukosis Virus), von dem die weit verbreiteten Vektoren N2 [A.D. Miller et al., Biotechniques 2, 980-990 (1989)] abgeleitet sind, indem für HFV keinerlei oncogenes Potential bekannt ist und eine sichere Verwendung von HFV-Vektoren anzunehmen ist. Außerdem verfügen Foamy Viren über ein ausgesprochen breites Wirtsspektrum, das fibroblastoide, epitheloide und lymphatische Zellen einschließt. Weiterhin teilen HFV-Derivate sichere Vektoren dadurch dar, daß die Anwesenheit des viralen Transaktivators bel-1 für die transkriptionelle Aktivität der Foamy Virus LTR (Long Terminal Repeat) zwingend notwendig ist. Wenn der Vektor aber die genetische Information für den bel-1 Transaktivator nicht enthält, kann kein mobilisierbarer, replikationskompetenter HFV-Vektor in der Zelle z. B. mit oncogenem Potential entstehen, weil die LTR-Sequenz ohne transaktivierendes bel-1 Gen nicht die Transkription aktiviert. Die Aktivierung von zellulären Oncogenen durch Insertionsmutagenese ist ebenfalls unwahrscheinlich. Weiterhin ist ein Sicherheitsfaktor für HFV-Derivate als Vektoren, daß endogene Homologe von Foamy Viren nicht bekannt sind und Rekombinationen mit endogenen Retroviren daher nicht in Frage kommen. Diese Beobachtung ist auch von Bedeutung für die besondere genetische Stabilität von Foamy Virus Vektoren in der Anwendung.

Rekombinante Foamy Viren, wie sie z. B. in den nachfolgend aufgeführten Konstruktionsbeispielen für pFOV-1 bis pFOV-4 beschrieben sind, eignen sich für den Transfer von genetischem Material in permanente tierische oder menschliche Zelllinien oder somatische Zellen in Menschen oder Tieren. Sie stellen einen Vektor für das Einbringen von Erbinformation in eukaryotische Zellen dar, der gegenüber herkömmlichen Gentransfersystemen (MoMLV, adenoassoziiertes Virus, Sindbis Virus oder Formulierungen von DNA mit Adenoviruspartikeln, Detergenzien und anderen Zusatzstoffen oder physikalische Methoden) in der Breite der Anwendungsmöglichkeiten und in der Effektivität des Gentransfers in die Zielzellen und in der Sicherheit der Handhabung Vorzüge aufweist.

So können die Foamy Virus Vektoren, die in den Beispielen genannt sind und eine multiple Klonierungssequenz für das Einfügen exogener Nukleinsäuren im Bereich des bel-1 oder bel-2 Gens aufweisen, für die nachfolgend genannten Verwendungen benutzt werden. Es sind aber auch andere Deletionen in der proviralen DNA von pHFV oder anderen Foamy Virus Isolaten möglich, um eine multiple Klonierungssequenz einzufügen und damit andersartige Foamy Virus Vektoren zu konstruieren.

Da solche rekombinanten Foamy Virus Vektoren ei-

ne exogene Nukleinsäure (DNA-Fragment) aufnehmen können, die in ihrer Länge durchaus 1700 Basenpaare überschreiten kann, können solche Foamy Virus Vektoren eine exprimierbare, exogene DNA für eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in Zelllinien für Produktionszwecke oder in somatische Zellen für medizinische oder diagnostische Zwecke einführen:

I. Foamy Virus Vektoren für die Vakzinierung

Die exogene Nukleinsäure in einem rekombinanten Foamy Virus Vektor kann ein oder mehrere komplette Gene zur Expression von einem oder mehreren Polypeptiden umfassen. Dabei können die Polypeptide geeignet sein, nach der Expression in transduzierten Zielzellen durch diesen Foamy Virus Vektor im Menschen oder im Tier eine humorale und/oder zelluläre Immunität auszulösen. Es ist gezeigt worden, daß insbesondere intrazellulär gebildetes Polypeptid für die Auslösung der zellulären Immunität von Bedeutung ist (J.B. Ulmer et. al. Science 259, 1745—1749 (1993)).

Foamy Virus Vektoren mit exogener Nukleinsäure, die virale Proteine von HIV, HTLV, Hepatitis B, Hepatitis C, humanem Papillomavirus, Zytomegalievirus, HSV, Influenzavirus, animalen Herpesviren wie z. B. PRV, BHV, EHV oder anderen Viren kodieren und in transduzierten, somatischen Zielzellen exprimieren, können potente Vakzine darstellen, die präventiv oder als Behandlungsmaßnahme nach der Infektion von Mensch oder Tier durch ein pathogenes Virus eingesetzt werden können.

Weiterhin können Foamy Virus Vektoren nach dem gleichen Prinzip für die Vakzinierung gegen bakterielle Infektionen, Mykoplasmainfektionen oder Infektionen durch Plasmodien oder andere Endoparasiten eingesetzt werden.

II. Foamy Virus Vektoren für die Expression therapeutischer RNA insbesondere für die Therapie von Virus- und Krebserkrankungen

Die exogene Nukleinsäure in rekombinanten Foamy Virus Vektoren kann ein oder mehrere Gene umfassen, die in transduzierten Zellen RNA exprimieren, die eine komplementäre (Antisense-)Nukleobasensequenz zu unerwünschten RNA-Molekülen in der Zielzelle aufweist, oder eine nuklease-aktive Ribozym-RNA aufweist.

Diese unerwünschten RNA-Moleküle können genomische RNA von Lentiviren oder anderen RNA-Viren sein. Es können Messenger RNA-Moleküle von intrazellulären Pathogenen wie Lentiviren (HIV, HTLV u. a.) Hepatitis B Viren, Hepatitis C Viren, humanen Papillomaviren, Zytomegalieviren, Epstein-Barr Viren, Herpes simplex Viren, Herpes Viren der Tiere (PRV, -BHV, EHV z. B.) oder andere pathogene Viren oder Mycoplasmen oder intrazellulär replizierende Prokaryonten sein.

Die unerwünschten RNA-Moleküle können aber auch mRNA-Transkripte von Oncogenen sein oder von anderen Genen, die ursächlich zu malignem Wachstum von somatischen Zellen beitragen. So würde man z. B. Foamy Virus Vektoren, die Antisense-RNA gegen das c-myc RNA-Transkript exprimieren, bei malignen Erkrankungen wie Burkitt-Lymphoma einsetzen. Die unerwünschten RNA-Moleküle können auch Proteine kodieren, die ursächlich an der Entstehung oder Manifestation von Autoimmunerkrankungen oder Stoffwech-

selerkrankungen beteiligt sind. Solche unerwünschten RNA-Moleküle können mit Hilfe komplementärer Antisense-RNA, die von einem rekombinanten Foamy Virus Vektor kodiert sein kann, durch Watson-Crick Basenpaarung sequenz-selektiv in transduzierten Zellen inaktiviert werden.

Daher können Foamy Virus Vektoren verwendet werden, um mit Hilfe der Antisense-RNA Expression in infizierten oder krankhaft veränderten Zellen, eine Therapie gegen bakterielle, virale oder andere Infektionskrankheiten, sowie eine Therapie gegen Krebs- oder Autoimmunerkrankungen durchzuführen.

Die mit Hilfe von Foamy Virus Vektoren exprimierte Antisense-RNA oder Ribozym-RNA kann auch gegen andere Gene, die an Stoffwechselkrankheiten oder neurodegenerativen Krankheiten beteiligt sind, gerichtet sein. So kann die Inaktivierung von mRNA kodierend für Alzheimers β -Amyloid-Proteinprecursor oder Acetylcholinesterase in neuronalem Gewebe mit Antisense-RNA oder Ribozym-RNA exprimiert durch Foamy Virus Vektoren von therapeutischem Nutzen sein.

Anstelle von exogener Nukleinsäure, die in therapeutisch zu nutzenden rekombinanten Foamy Virus Vektoren Antisense-RNA kodiert, läßt sich eine exogene Nukleinsäure in Foamy Virus Vektoren einführen, die eine Köder-RNA ("decoy-RNA") kodiert.

Köder-RNA kann eine starke antivirale Wirkung entfalten und z. B. zur Behandlung von Virusinfektionen eingesetzt werden.

Zu diesem Zweck enthält die Köder-RNA bestimmte Nukleobasensequenzen, die ihrerseits virale Proteine binden, die für die Replikation eines pathogenen Virus essentiell sind. So können z. B. Köder-RNA Sequenzen in vielfacher Kopienanzahl die TAR-Nukleobasensequenz und die REV-Responsive-Element Nukleobasensequenz (RRE) aus HIV enthalten und die regulatorischen Proteine tat und rev von HIV kompetitiv binden und dadurch die HIV-Replikationsrate in der infizierten Zelle senken. Dies bedeutet einen therapeutischen antiviralen Effekt.

Die Köder-RNA kann aber auch die Verpackungssequenz von Lentiviren enthalten, wie sie z. B. für HIV in der genomischen RNA zwischen 5'-LTR und bis in die gag-Sequenz hineinreichend beschrieben ist.

III. Foamy Virus Vektoren für die Expression von Polypeptiden zur Therapie von Virus-, Krebs- und Autoimmunerkrankungen

Die exogene Nukleinsäure in einem rekombinanten Foamy Virus Vektor kann ein oder mehrere Gene zur Expression von Polypeptiden umfassen. Werden diese Polypeptide in der durch den Vektor transduzierten Zielzelle exprimiert, so können diese Polypeptide transdominant negativ regulierende Proteine sein, die die Replikationsrate eines pathogenen Virus hemmen und daher antiviral wirksam sind. Transdominant negativ regulierende Proteine sind z. B. Proteine, die den Aufbau von Viruspartikeln stören oder ein verändertes tat-Protein oder rev-Protein von HIV darstellen.

Diese veränderten Proteine binden zwar noch die TAR oder RRE-Sequenz der HIV-RNA, aber durch eine Mutation im nicht bindenden Teil des Proteins wird ihre biologische Funktion, nämlich die Antitermination der Transkription (die tat-Funktion) oder die RNA prozessierende Funktion von rev nicht mehr ausgebildet.

Andere antivirale Polypeptide mit therapeutischer Wirkung bei Viruserkrankungen sind solche, die dem

Rezeptor für die Internalisierung des pathogenen Virus an der Virusbindestelle gleichen. Mit Hilfe eines Foamy Virus Vektors lassen sich Polypeptide im Organismus exprimieren und sezernieren, die an die Bindungsstelle des pathogenen Virus binden, die für das Anbinden des Virus an den zellulären Rezeptor von Bedeutung ist, und damit die Virusaufnahme in die Zelle blockieren. Von therapeutischer Wirkung in diesem Zusammenhang könnte ein Foamy Virus Vektor sein, der ein CD4-Polypeptidfragment exprimiert, das durch die Bindung an gp 120 von HIV die de novo Infektion von menschlichen Zellen durch HIV unterbindet.

In ähnlicher Weise könnte das mit Hilfe von rekombinantem Foamy Virus Vektor gebildete Polypeptid einen löslichen Teil eines Wachstumsfaktorrezeptors darstellen und überexprimierten Wachstumsfaktor, der zu malignem Zellwachstum führt, abfangen. Dadurch würde der Foamy Virus Vektor Antitumoreigenschaften ausprägen.

Dieses Prinzip ließe sich auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen anwenden. Zwei Beispiele seien in diesem Zusammenhang genannt:

1. Zur Immunsuppression, auch zur Vermeidung der Organtransplantatabstoßung, wird ein Foamy Virus Vektor verwendet, der mit Hilfe seiner exogenen Nukleinsäure einen sezernierbaren Anti-Interleukin-2 Antikörper im Zielgewebe exprimiert.
2. Der Foamy Virus Vektor exprimiert ein sezernierbares Polypeptid im Zielgewebe, das ein Peptidfragment der Acetylcholinrezeptor alpha-Untereinheit enthält und zur Bindung und Inaktivierung von Antikörpern bei Patienten mit Myasthenia gravis befähigt ist.

Andere mit Hilfe von rekombinanten Foamy Virus Vektoren exprimierten Polypeptide könnten Lymphokine wie etwa Interleukin-2 in neoplastisch transformierten aber chemisch oder physikalisch proliferationsgehemmten Zellen zur Immuntherapie bei Krebs sein. Dabei werden die Zellen für die Immuntherapie ex vivo mit Foamy Virus Vektor transduziert.

Für die antivirale- und/oder die Krebs-Therapie ist auch die Foamy Virus Vektor vermittelte Expression von einem oder mehreren Interferonen im Zielgewebe denkbar.

Weiterhin ist für die Behandlung von neoplastisch transformierten Zellen oder Zellen, die durch Lentiviren oder Hepatitis Viren befallen sind, eine Therapie mit rekombinanten Foamy Virus Vektoren dadurch möglich, daß die Vektoren im Zielgewebe ein Toxin exprimieren oder ein Polypeptid, das erst durch das intrazelluläre Pathogen oder den besonderen Stoffwechsel der neoplastisch transformierten Zelle in ein zytotoxisches Polypeptid umgewandelt wird. Foamy Virus Vektoren könnten zur Expression von Ricin A oder Diphtherie-Toxin oder Staphylococcus aureus Enterotoxin B oder Colicin E oder andere Toxine konstruiert werden. Für die zell- oder organspezifische Expression solcher Produkte würden Foamy Virus Vektoren konstruiert werden, die das zytotoxische Polypeptid unter der Kontrolle eines zell- oder organspezifischen Promotors bilden.

Andere therapeutische Proteine, die durch rekombinante Foamy Virus Vektoren endogen in Zielzellen exprimiert werden können, sind z. B. Proteaseinhibitoren gegen virale Proteasen von pathogenen Lentiviren oder Hepatitis Viren. Es können auch Proteaseinhibitoren gegen Elastase und/oder Trypsin und andere Proteasen

sein, die bei der Schock-Lunge, Emphysem und anderen Krankheitszuständen zu hemmen sind. Es können auch Proteine wie z. B. Tumor Nekrose Faktor (TNF) sein, die zur Krebsbehandlung mit Foamy Virus Vektoren verwendet werden können. Weiterhin können mit Hilfe der Expression durch Foamy Virus Vektoren fehlende Tumor-Suppressorgene exprimiert werden.

IV. Foamy Virus Vektoren zur homologen Rekombination mit zellulärer, chromosomaler DNA

Unerwünschte Gene, z. B. provirale DNA von Lentiviren, amplifizierte Oncogene, Erbkrankheiten auslösende Gene und andere Gene können durch Foamy Virus Vektoren, die exogene Nukleinsäure mit homologen DNA-Sequenzen zu den unerwünschten Genen enthalten, inaktiviert werden. Dafür ist die exogene Nukleinsäure der Foamy Virus Vektoren so ausgewählt, daß sie mit hoher Frequenz in bevorzugter Weise durch homologe Rekombination zur Zerstörung der entsprechenden zellulären Gene führt. Auf diese Weise kann aber auch ein defektes Gen am Genort durch Rekombination mit dem intakten Gen der exogenen Nukleinsäure des Foamy Virus Vektors korrigiert werden.

V. Foamy Virus Vektoren zur somatischen Gentherapie von Erbkrankheiten

Erbkrankheiten wie z. B. Defizienzen in den Blutgerinnungsfaktoren VIII oder Faktor IX, oder in Adenosindesaminasedefizienz, oder in Hämoglobinopathien oder in zystischer Fibrose, oder in familiärer Hypercholesterinämie oder in erblichem Emphysem oder in Duchenne Muskeldystrophie oder in anderen Erbkrankheiten können durch den Transfer des entsprechenden, korrekten Gens mit Hilfe von Foamy Virus Vektoren in somatische Zellen behandelt werden.

VI. Foamy Virus Vektoren zur Behandlung von Herzkreislauferkrankungen

Rekombinante Foamy Virus Vektoren, deren exogene Nukleinsäure ein oder mehrere Gene zur Expression von Polypeptiden umfassen, die blutdruckregulierend wirken, können konstruiert werden. So können die Polypeptide z. B. transdominant negativ regulierende atriale natriuretische Peptide sein. Es können Polypeptide zur Bindung und Inaktivierung des zirkulierenden ANP (atriales natriuretisches Peptid) oder ANF (atrialer natriuretischer Faktor) sein. Diese Polypeptide können z. B. antikörperähnliche Proteine sein oder es können z. B. lösliche Rezeptor-Derivate von ANP oder ANF bindenden Rezeptoren sein. Es können Renin-Inhibitoren oder Inhibitoren der Angiotensin-Converting-Enzyme sein, um einige Beispiele zu nennen.

Die Gene der exogenen Nukleinsäure aus Foamy Virus Vektoren können aber auch Produkte kodieren, die die Ausbildung von Arteriosklerose oder andere Herzkreislauferkrankungen verhindern. Diese Produkte können proliferationshemmende Stoffe für Endothelzellen oder Zellen der glatten Muskulatur sein, z. B. Antisense-RNA gegen c-myc mRNA oder gegen TGF- β mRNA, um Beispiele zu nennen.

Das durch einen Foamy Virus Vektor gebildete therapeutische Produkt kann aber auch in diesem Zusammenhang der LDL-Rezeptor sein.

Foamy Virus Vektoren lassen sich konstruieren zur Expression von Antisense-RNA oder Ribozym-RNA,

die gegen adhäsive Proteine wie z. B. E-Selectin oder P-Selectin gerichtet ist. Neben der Translationshemmung der mRNA von ausgewählten adhäsiven Proteinen durch komplementäre RNA, können die Foamy Virus Vektoren auch exogene Nukleinsäure zur Expression von Polypeptiden enthalten, die in die Blutbahn sezerniert werden und die Wechselwirkung von Blutzellen untereinander (z. B. Blutplättchen-Aggregation) oder von Blutzellen mit Endothelzellen dadurch blockieren, daß diese Polypeptide selektiv an adhäsive Proteine wie z. B. E-Selectin oder P-Selectin binden.

Die Blockierung von adhäsiven Proteinen im Blut und an Endothelzellen ist als therapeutisches Prinzip bei krankhaften Gefäßveränderungen und Entzündungskrankheiten von Bedeutung.

VII. Foamy Virus Vektoren für diagnostische Anwendungen

Die exogene Nukleinsäure von rekombinanten Foamy Virus Vektoren kann ein Gen oder ein Genfragment umfassen, das in der Zelle durch einen nachzuweisenden Stoff aktiviert wird und dadurch spezifisch und mit verstärktem Signal in einer hochsensitiven Weise den nachzuweisenden Stoff detektierbar macht.

Als Beispiel sei hier der Nachweis eines viralen oder bakteriellen Transaktivatorproteins in Zellen aus Biopsie-Material, Körperflüssigkeiten, Zelllinien, Produktionszelllinien oder anderen Zellen genannt. Durch Kopplung einer transaktivierbaren Gensequenz mit einem nachgeschalteten Reporter gen wie z. B. Luciferase oder β -Galactosidase oder eine Peroxidase, können solche Transaktivatorproteine, die ihrerseits etwa eine Infektion belegen, sensitiv durch einen Foamy Virus Vektor in den zu untersuchenden Zellen nachgewiesen werden.

VIII. Konstruktion von Foamy Virus Vektoren durch in vitro Neukombination von Nukleinsäuren

Der Klon pHFV (Abb. 1) ist ein Derivat von pHSRV. pHSRV weist in dem 3'-LTR eine Insertion von etwa 150 Basenpaaren von nicht-viraler DNA auf. In pHFV wurde daher das 3'-LTR durch das entsprechende Afl I/Xba I-Fragment des 5'-LTR ersetzt. Ausgehend von infektiösem Plasmid pHFV, das ein Derivat des infektiösen molekularen Klons pHSRV ist und durch cDNA-Klonierung sowie durch Klonierung nicht integrierter viraler DNA des humanen Foamyvirus/humanen Spumaretrovirus gewonnen wurde (A. Rethwilm et al. Gene 59, 19–28 (1987); A. Rethwilm et al. Nucleic Acids Res. 18, 733–738 (1990)), wurden durch Deletion mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen AccI in der Nukleotid-Position 10420 und HindIII in der Nukleotid-Position 10844 Deletionen im Bereich der bel-1/bel-2 Gene eingeführt. In diese Deletion wurde eine multiple Kloniersequenz mit den Schnittstellen für EcoRV, SmaI und NruI inseriert. Auch auf diese Weise wurden die Foamy Virus Vektoren pFOV-1, pFOV-2 und pFOV-3 dargestellt (siehe auch Abb. 1–4). Alle Nukleotidpositionen beziehen sich auf den Klon pHFC. Die Angaben bezogen auf genomische HFV-RNA sind durch Abzug von 829 Nukleotiden bei allen Nukleotidpositionen zu erhalten.

Diese Vektoren sind replikationskompetent und wurden erfolgreich zur Expression exogener Nukleinsäure verwendet (z. B. zur Expression des CAT-Gens (Chloramphenicolacetyltransferase)).

Der Vektor pFOV-4 (Abb. 1 und 5) wurde durch De-

letion der proviralen DNA zwischen den Schnittstellen EcoRI (Nukleotid-Position 9529) und HindIII (Nukleotid-Position 10844) dargestellt. Diener Foamy Virus Vektor ist replikationsinkompetent.

IX. Produktion von Foamy Virus Vektoren

Die replikationskompetenten Foamy Virus Vektoren wie z. B. pFOV-1 bis pFOV-3 lassen sich in Zelllinien wie z. B. HBL 299 (ATCC CCL 137) humanen, embryonalen Lungenfibroblastenzellen, BHK-21 (C-13) (ATCC CCL 10) Hamsternierenzellen, CF2TH (ATCC CRL 1430) Hundethymus-Zelllinie, MRC5 (ATCC CCL 171) humane Lungenzelllinie, CHO Chinese Hamster Ovary-Zelllinie, VERO (ATCC CCL 81) African Green Monkey Nieren-Zelllinie, 3T3-TK (ATCC CCL 92) Mausfibroblasten-Zelllinie oder anderen Zelllinien, Primärgewebekulturen oder infizierten Tieren propagieren. Die Zellkulturüberstände oder Flüssigkeiten aus infizierten Tieren, die infektiöse Foamy Virus Vektor Partikel enthalten, können für die Infektion von Zielzellen eingesetzt werden.

Replikationsinkompetente Foamy Virus Vektoren werden mit gentechnisch veränderten Verpackungszelllinien produziert. Der replikationsinkompetente Foamy Virus Vektor weist Gendelektionen auf, die eine Replikation des Vektors in einer somatischen, nicht durch replikationskompetente Foamy Viren infizierten Zelle, ausschließen. Diese Gendelektionen können neben den bel-Genen den gag-Genbereich und/oder den pol-Genbereich und/oder den env-Genbereich umfassen.

Die Proteine der oder des deletierten Gens werden durch ein oder mehrere Gene aus Foamy Virus gebildet, die z. B. durch konventionellen Gentransfer (z. B. Elektroporation oder CaPO_4 -räzipitation) in eine Verpackungszelllinie transfiziert wurden. Die Verpackungszelllinie zeichnet sich durch die Expression von einem oder mehreren Foamy Virus Proteinen wie gag-, pol- und/oder env-Proteinen aus, die es erlauben, die genomische RNA des Vektors, die auch die exogene Nukleinsäure beinhaltet, in infektiöse Foamy Virus Partikel zu verpacken, weil diese Proteine in trans in der Verpackungszelllinie bereitgestellt werden.

Aus Sicherheitsgründen lassen sich auf diese Weise infektiöse aber nicht replikationsfähige Foamy Virus Vektor Partikel produzieren. Die Verpackungszelllinie kann eine der obengenannten Zelllinien oder eine andere, geeignete Zelllinie sein.

Andererseits kann der Foamy Virus Vektor aber auch als reine provirale DNA aus einer entsprechend klonierten Plasmid-DNA gewonnen werden und mit oder ohne Formulierungshilfsstoffe wie z. B. kationische Lipide oder Proteine, die einen Carrier darstellen, direkt durch Injektion, Elektroporation, Partikelbeschuß oder ähnliche Techniken für medizinische oder diagnostische Anwendungen in die Zielzellen gebracht werden.

Legenden der Abbildungen

Abb. 1

Schematische Darstellung der Genomstruktur von pHFV (infektiöse provirale DNA von humanem Spumaretrovirus HSRV) und durch Deletionen an den Schnittstellen AccI (Nukleotid-Position 10420) und HindIII (Nukleotid-Position 10844) daraus abgeleitete Foamy Virus Vektoren pFOV-1, pFOV-2 und pFOV-3. Der replikationsinkompetente Vektor pFOV-4 weist eine größere Deletion zwischen EcoRI (Nukleotid-Position

9529) und HindIII (Nukleotid-Position 10844) auf. Anstelle der Deletionen wurden multiple Klonierstellen eingeführt, z. B. die hier gezeigte mit EcoR V, SmaI und NruI Schnittstellen.

Abb. 2

5

Restriktionskarte des Foamy Virus Vektors pFOV-1.

Abb. 3

10

Restriktionskarte des Foamy Virus Vektors pFOV-2.

Abb. 4

15

Restriktionskarte des Foamy Virus Vektors pFOV-3.

Abb. 5

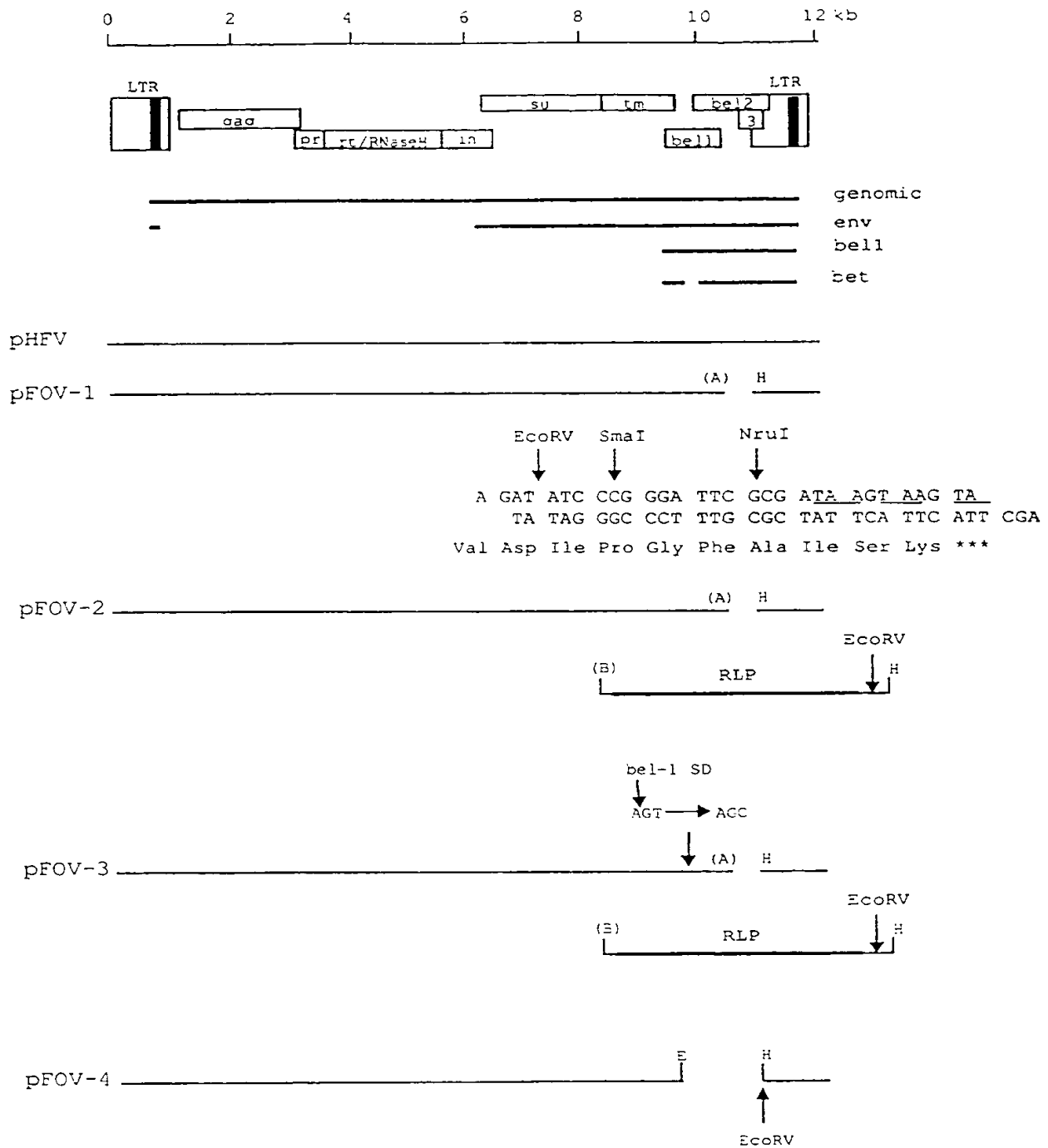
Restriktionskarte des Foamy Virus Vektors pFOV-4. 20

Patentansprüche

1. Foamy Virus Vektor, der eine exogene Nukleinsäure zur Expression von einem oder mehreren Gen-Produkten mit therapeutischer, vakzinierender oder diagnostischer Wirkung enthält. 25
2. Foamy Virus Vektor gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Foamy Virus Vektor ein Derivat von pHFV (infektiöse oder nicht infektiöse DNA von humanem Spumaretrovirus HSRV) mit einer Deletion im Bereich der bel-1, bel-2 und bel-3 Gene ist zur Insertion der exogenen Nukleinsäure. 30
3. Foamy Virus Vektor gemäß den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die exogene Nukleinsäure ein komplettes Gen oder mehrere komplette Gene zur Expression von Polypeptiden für die humorale und/oder die zelluläre Immunisierung enthält. 35
4. Ein Foamy Virus Vektor gemäß den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die exogene Nukleinsäure ein Gen zur Expression von Antisense-RNA, Ribozym-RNA oder Köder-RNA enthält. 40
5. Ein Foamy Virus Vektor gemäß den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die exogene Nukleinsäure Genprodukte zur Hemmung der Tumorbildung exprimiert. 45
6. Foamy Virus Vektor gemäß den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die exogene Nukleinsäure Genprodukte exprimiert, die Gendefekte im Zielorganismus beheben. 50
7. Foamy Virus Vektoren gemäß den Ansprüchen 1 bis 6 zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Herz-Kreislaufkrankungen Tumoren, viralen Erkrankungen oder Gendefekten. 55
8. Foamy Virus Vektoren gemäß Anspruch 1 bis 6, die eine exogene Nukleinsäuresequenz zur Expression eines Produktes für diagnostische Verwendungen enthalten.
9. Arzneimittel enthaltend Foamy Virus Vektoren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7. 60
10. Eukaryotische Zelllinien oder rekombinante eukaryotische Zelllinien zur Produktion von Foamy Virus Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9. 65

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



RLP = ribosomal landing pad
 SD = splice donor
 E = EcoRI (pHFV-NT 9529)
 A = AccI (pHFV-NT 10420)
 H = HindIII (pHFV-NT 10844)

Abb. 1

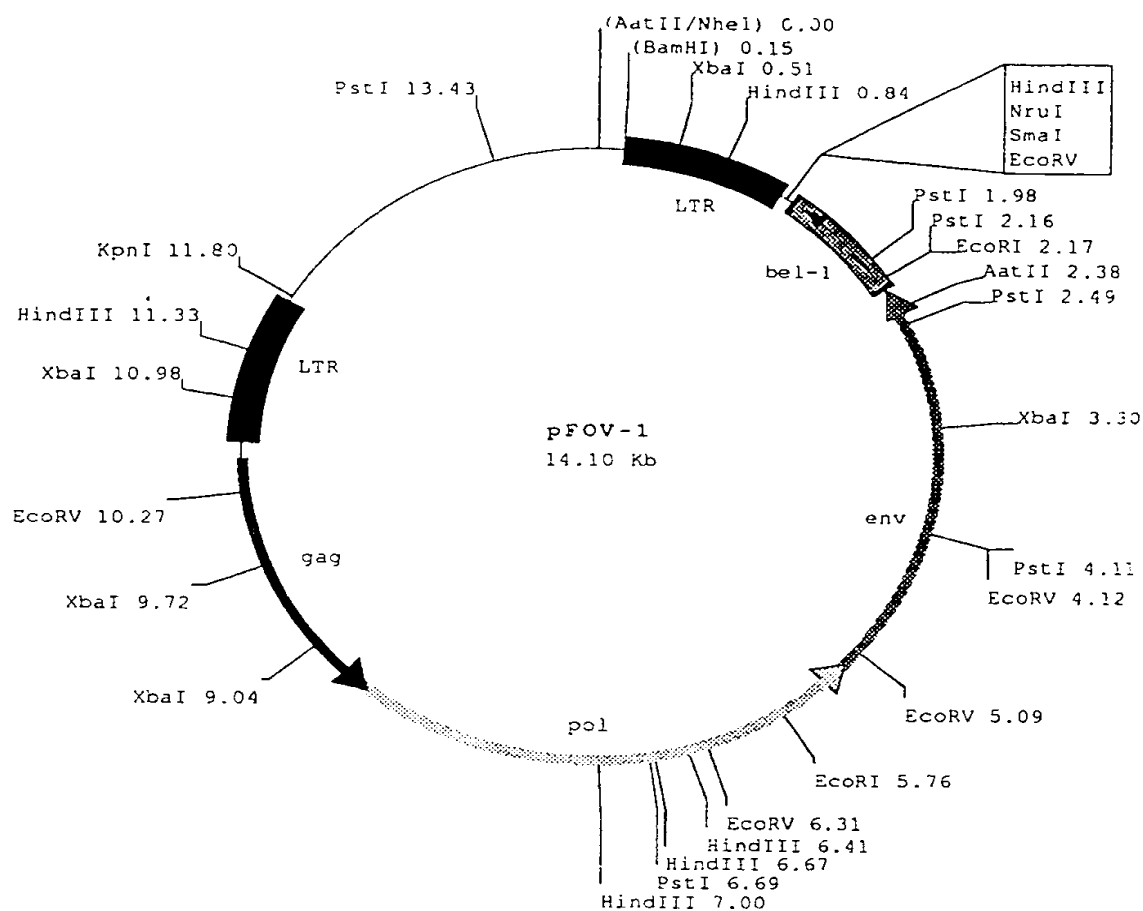


Abb. 2

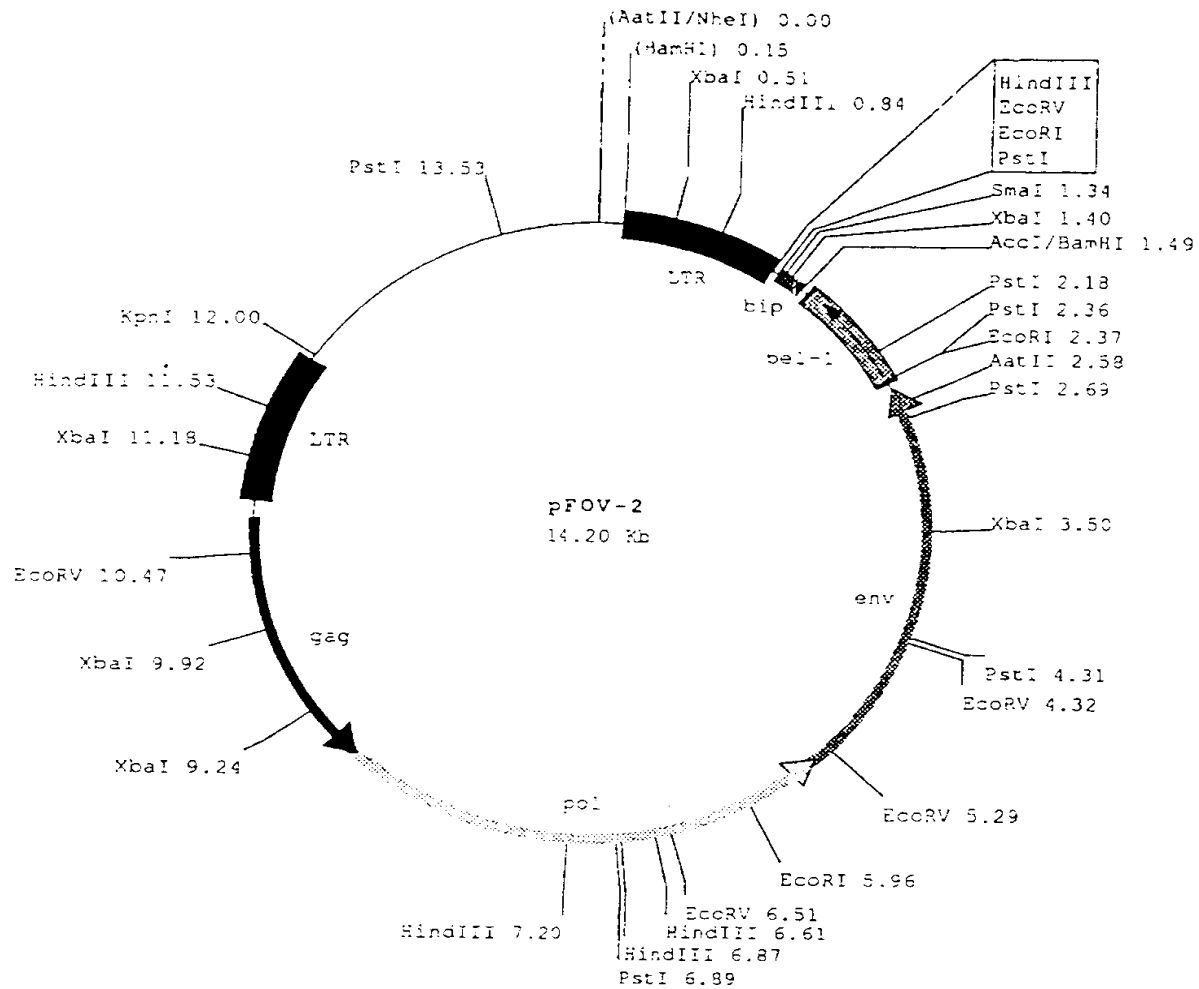


Abb. 3

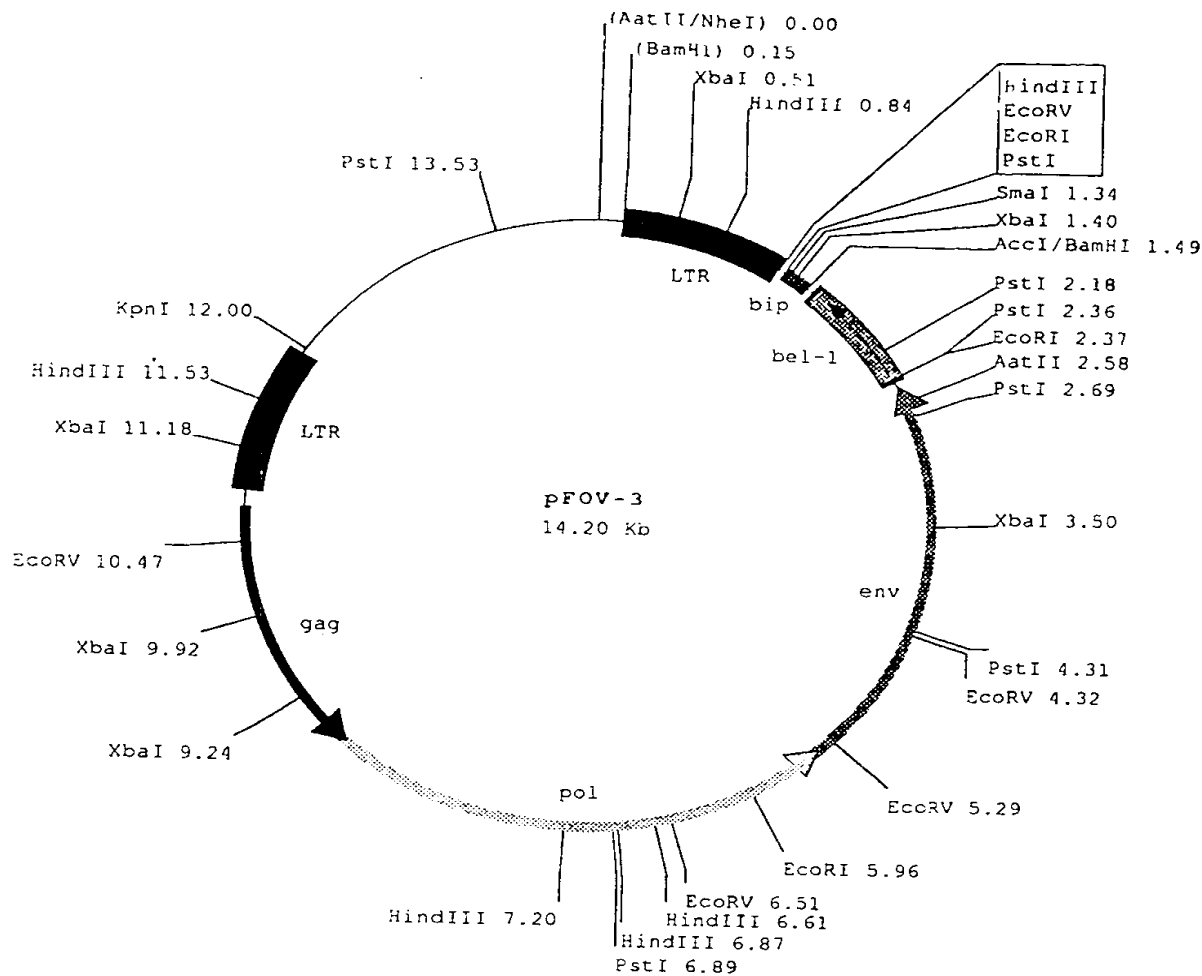


Abb. 4

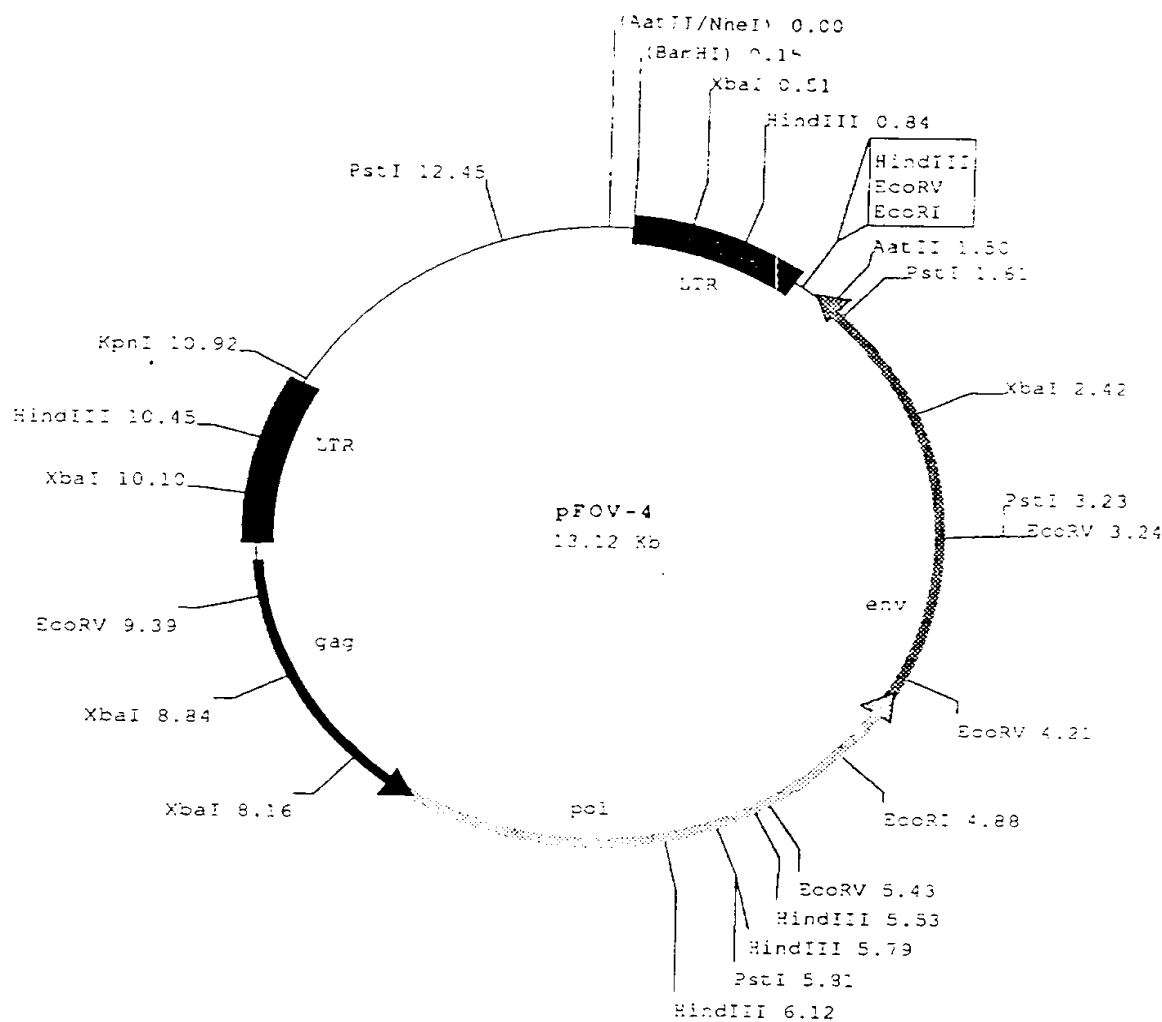


Abb. 5